

Veronika Cencen<sup>1</sup>, Jernej Kovač<sup>2</sup>, Simon Horvat<sup>3</sup>, Primož Kotnik<sup>4</sup>

# Biotehnoški pristopi k zdravljenju debelosti

## *Biotechnological Strategies in Treatment of Obesity*

### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: debelost, biotehnologija, rekombinantna zdravila, gensko zdravljenje

Debelost je klasična večvzročna pogojena bolezen. Poleg vpliva okolja ima pomembno vlogo pri njenem nastanku tudi dednost. Debelost je le redko monogensko pogojena, opredeljenih pa je bilo tudi že več 100 genov in mest v genomu, ki vsak v majhnem deležu sodelujejo pri razvoju mnogo pogostejše poligenske debelosti. Debelost pri otrocih in mladostnikih predstavlja kratko- in dolgoročno ogroženost za zaplete. Običajni načini zdravljenja so žal le delno učinkoviti. Povečevanje pogostosti debelosti povečuje potrebo po izdelavi novih strategij zdravljenja. Biotehnoške metode predstavljajo pomembno orodje za razvoj teh strategij. V članku so predstavljene biotehnoške metode, ki so trenutno že uporabljene za pripravo učinkovin in metod za zdravljenje debelosti. Razpravljamo o njihovi učinkovitosti in varnosti ter o možnostih za dodatni razvoj. Predstavljamo tudi novejši biotehnoški metode, ki trenutno še niso v uporabi za zdravljenje debelosti, a imajo ta potencial. Razpravljamo tudi o dodatnih možnostih uporabe biotehnoških metod za opredelitev tarčnih genov in mehanizmov, ki vodijo v debelost.

### ABSTRACT

KEY WORDS: obesity, biotechnology, recombinant drug therapy, gene therapy

Obesity is a complex multifactorial disease. Both genetics and environmental factors play a major role in the development of obesity. It is rarely monogenic and several 100 of genes and loci, each having a minor effect, have been associated with the polygenic form. Obesity in children and adolescents presents a short and long-term risk for obesity-related diseases. Classical methods of treatment are unfortunately only partially effective. The ever increasing prevalence of obesity cases calls for novel treatment strategies. Biotechnology offers several important tools for the development of these strategies. Biotechnological methods already used for the preparation of drug therapies and other methods for treating obesity are presented in the article. We discuss their efficacy and safety, and possibilities for further improvement. Novel biotechnological approaches that have not yet been used in the treatment of obesity but show potential are also discussed. Furthermore, we also explore the possibility of using biotechnological methods to determine the main target genes and mechanisms of obesity.

<sup>1</sup> Veronika Cencen, dipl. bioteh., Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale

<sup>2</sup> Dr. Jernej Kovač, univ. dipl. biokem., Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Prof. dr. Simon Horvat, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale; Odsek za sintezno biologijo in imunologijo, Kemijski inštitut, Hajdrihova ulica 19, 1000 Ljubljana

<sup>4</sup> Doc. dr. Primož Kotnik, dr. med., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana; Katedra za pediatrijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana; primoz.kotnik@mf.uni-lj.si

## UVOD

Debelost je pomemben javnozdravstveni problem zaradi presnovnih in nepresnovnih zapletov, s katerimi je povezana. Osnova zdravljenja je sprememba življenjskega sloga, kamor sodijo zdrava prehrana, redna in primerno intenzivna telesna dejavnost ter omejen čas, ko nismo telesno dejavni. Do sedaj razvita zdravila niso zelo učinkovita in imajo večinoma pomembne neželene učinke (1). Učinkovitejši so bariatrični posegi, a so relativno invazivni, izrednega pomena pa je tudi doživljenjsko pooperativno sledenje, zato so ti posegi primerni le za manjši delež populacije debelih (2). Zaželeni so novi pristopi k zdravljenju debelosti, ki bi bili učinkoviti in varni. S tega vidika v članku predstavljamo noveše biotehnoške metode, s katerimi bi lahko izboljšali učinkovitost in varnost že uveljavljenih zdravil in metod ter razvili nova.

## METODA REKOMBINANTNE DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISLINE ZA IZDELAVO UČINKOVIN ZA ZNIŽANJE TELESNE MASE ALI PRESNOVNO UGODNO SPREMEMBO TELESNE SESTAVE

V biotehnologiji se pogosto uporablja metoda rekombinantne DNA, s katero se izboljša učinkovitost produkta in raven proizvodnje rekombinantnih beljakovin. S plazmidom vnesemo DNA, ki kodira izbrano (človeško) beljakovino, v bakterijsko gostiteljsko celico. V celici se sintetizira beljakovina, ki sicer v naravnem sevu ne obstaja (3). Naštetih je nekaj primerov uporabe te metode za izdelavo učinkovin, ki vplivajo na telesno maso in sestavo telesa.

### Leptin, leptinski receptor in postreceptorske signalne poti

Odkritje hormona leptina je eno prvih in največjih odkritij, ki so vplivala na razumevanje genetskih nagnjenosti za uravnavanje telesne mase. Leptin je beljakovina, ki se tvori izključno v maščobnem tkivu. Se-

stavljen je iz 146 aminokislin, kodira ga gen *LEP*. Preko receptorja za leptin, ki ga kodira gen *LEPR*, leptin posredno sproži tvorbo anoreksigenega neuropeptida proopiomelanokortina (angl. *proopiomelanocortin*, POMC) in zavira proizvodnjo oreksigene aguti podobne beljakovine (angl. *agouti-related protein*, AgRP). Leptin naj bi deloval kot lipostat, saj se z večanjem količine maščob v maščobnih celicah sprošča v kri in povzroča občutek sitosti. Posledica pomanjkanja leptina ali mutacija v genu za leptinski receptor je zgodnja in izrazita debelost s pridruženimi zdravstvenimi zapleti. Zdravljenje z rekombinantnim leptinom je učinkovito pri zdravljenju redkih oblik debelosti, ki so posledica pomanjkanja leptina (4). Nasprotno pa je zdravljenje z rekombinantnim leptinom neučinkovito pri poligenško dedovani oz. najpogostejši obliki debelosti, kjer je pridobljena odpornost na leptin eden glavnih mehanizmov, ki vodijo v povečevanje telesne mase oz. neučinkovitost zdravljenja z leptinom (5).

Odpornost na leptin so obšli z razvojem zdravila, ki brez aktivacije receptorja za leptin deluje na njegove efektorje. Ciliarni nevrotrofični dejavnik (angl. *recombinant neurotrophic factor*, CNTF), ki ga kodira gen *CNTF*, je polipeptidni hormon in rastni dejavnik živčnih celic ter v živčnem sistemu spodbuja tvorbo živčnih prenašalcev. Pri živalskih modelih se CNTF dokazano izogne učinkom odpornosti na leptin. Rekombinantna različica ciliarnega nefrotičnega dejavnika (angl. *recombinant human variant ciliary neurotrophic factor*, rhvCNTF) z zaščitenim imenom Axokine®, ima še izboljšano učinkovitost in farmakološke lastnosti. Veže se na receptor za CNTF in aktivira podobne znotrajcelične signalne poti kot leptin ter vpliva na spremembe apetita in telesno maso (38). Kljub dokaj veliki učinkovitosti pa ni prišel na tržišče, saj so preiskovanci razvili protitelesa proti CNTF. Ta niso le zmanjšala učinkovitosti zdravljenja, temveč bi lahko škodljivo vplivala tudi

na nevrozaščitno delovanje endogenega CNTF (7). Podjetje Xencor za razvoj zdravljenja z monoklonskimi protitelesi do sedaj še ni bilo uspešno pri razvoju analogov z manjšo imunogenostjo. Te iščejo z analizo spremenjenih epitopov alelov pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa II (8).

## Rekombinantni človeški rastni hormon

Rastni hormon je peptidni hormon, ki spodbuja rast, delitev in obnavljanje celic. Poleg tega ima pomembne fiziološke učinke na telesno sestavo. Zmanjšuje delež maščobnega tkiva in povečuje delež nemaščobnega tkiva (mišice). Tako pri odraslih kot pri otrocih s čezmerno telesno maso je zmanjšano endogeno in spodbujeno izločanje rastnega hormona (9). Osebe s pomanjkanjem rastnega hormona pa so nagnjene k debelosti, posebej visceralni (10).

Rekombinantni človeški rastni hormon (angl. *recombinant human growth hormone*, rhGH) se uporablja za zdravljenje bolezni, ki so posledica pomanjkanja rastnega hormona ali zmanjšane občutljivosti nanj. Poudarjamo, da rhGH ni indiciran za zdravljenje debelosti. Sicer pa rhGH znižuje delež maščobnega tkiva in povečuje mišično maso brez znatne izgube skupne telesne mase (11). Zaradi teh učinkov je indiciran za zdravljenje redkega sindroma Prader-Willi, pri katerem sta poleg zmanjšanega izločanja rastnega hormona prisotni hipotalamična okvara, in debelost. Pri zdravljenju sindroma Prader-Willi z rhGH je glavni pričakovani učinek ugodna sprememba telesne sestave (12).

Zdravljenje z rhGH, predvsem v odmerkih, višjih od fizioloških, je povezano s povišanjem ravnin inzulina ter razvojem motene tolerance za glukozo in sladkorne bolezni (13). Nedavno je bilo objavljeno poročilo o povečanem tveganju za možgansko-žilni dogodek tudi pri osebah, ki so bile zdravljene s fiziološkimi odmerki rhGH zaradi nizke rasti (14). Navedeni neželeni

učinki zdravila zelo omejujejo možno uporabo rhGH za zdravljenje čezmerne telesne mase oz. za izboljšanje telesne sestave.

## Kombinacijsko zdravljenje

Učinkovitost zdravljenja z zdravili lahko povečamo z ustrezno kombinacijo zdravil. V primeru debelosti je to kombinirana uporaba amilinskega analoga pramlintina, ki poveča signalizacijo z leptinom, in rekombinantnega človeškega leptina metreleptina. Kombinirana uporaba teh dveh zdravil je prestala klinične raziskave druge faze, vendar pa so nadaljnje raziskave trenutno ustavljene zaradi varnostnih razlogov (1). Metreleptin je v bakterijah *Escherichia coli* proizveden rekombinanten človeški leptinski analog, ki se veže na leptinski receptor in ga aktivira. Od naravno prisotnega človeškega leptina se razlikuje v dodatnem metioninskem ostanku na aminskem koncu. Uporaba je zelo omejena, saj obstaja nevarnost razvoja protiteles, ki bi hkrati delovala tudi na endogeni leptin, prav tako pa se poveča tveganje za razvoj limfomov (15). Čeprav znižuje raven krvnega sladkorja in izboljša stanje odpornosti na inzulin, pa pri zniževanju telesne mase ni učinkovit (16).

## BIOTEHNOLOŠKE METODE ZDRAVLJENJA NA RAVNI GENOMA

Le do 5% primerov debelosti (predvsem izrazite) je pogojenih z mutacijami v enem samem genu (t. i. monogenska debelost). Nekaj pomembnejših je povzetih v tabeli 1. Pogosteje je debelost posledica skupnega učinka variabilnosti v več genih, ki jih je potrebno upoštevati, t. i. oligo- ali poligenska debelost. Do sedaj je bilo opredeljenih že več 100 genov in lokusov, ki prispevajo k tej obliki debelosti. Opredelili so jih s pomočjo asociacijskih raziskav na celotnem genomu (angl. *genome-wide association studies*, GWAS) in v zadnjem času s sekvencioniranjem celotnega genoma (17, 18).

**Tabela 1.** Geni, povezani z debelostjo (17).

Gen	Angleško ime gena	Slovensko ime gena	Lokacija	Funkcija beljakovine
<i>ADRB2</i>	<i>β<sub>2</sub>-adrenoceptor, surface gene</i>	gen za površinski β <sub>2</sub> -adrenergični receptor	5q31–q32	poraba energije
<i>ADRB3</i>	<i>β<sub>3</sub>-adrenoceptor, surface gene</i>	gen za β <sub>3</sub> -adrenergični receptor	8p12–p11.2	
<i>UCP1</i>	<i>uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier) gene</i>	gen za odklopno beljakovino 1 – termogenin (mitohondrijski, protonski prenašalec)	4q28–q31	
<i>UCP2</i>	<i>uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) gene</i>	gen za odklopno beljakovino 2 (mitohondrijski, protonski prenašalec)	11q13.3	
<i>UCP3</i>	<i>uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier) gene</i>	gen za odklopno beljakovino 3 (mitohondrijski, protonski prenašalec)	11q13	
<i>CLOCK</i>	<i>clock circadian regulator gene</i>	gen za cirkadiani ritem	4q12	
<i>INS</i>	<i>insulin gene</i>	gen za inzulin	11p15.5	vnos energije
<i>LEP</i>	<i>leptin gene</i>	gen za leptin (človeški homolog debelostnega gena v miših)	7q31.3	
<i>MC4R</i>	<i>melanocortin 4 receptor gene</i>	gen za melanokortinski receptor 4	18q22	
<i>NPY</i>	<i>neuropeptide Y gene</i>	gen za neuropeptid Y	7p15.3	
<i>POMC</i>	<i>proopiomelanocortin gene</i>	gen za proopiomelanokortin	2p23.3	
<i>AGRP</i>	<i>agouti-related peptide gene</i>	gen za aguti podobno beljakovino	16q22	
<i>CARTPT</i>	<i>cocaine and amphetamine regulated transcript prepropeptide gene</i>	gen za prepropeptid kokain in amfetamin uravnavanega transkripta	5q13.2	
<i>FTO</i>	<i>fat mass and obesity associated gene</i>	gen za beljakovino, povezano z maščobnim tkivom in debelostjo	16q12.2	
<i>LEPR</i>	<i>leptin receptor gene</i>	gen za leptinski receptor	1p31	
<i>PPARγ2</i>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ gene</i>	gen za γ-receptor, aktiviran s peroksisom proliferatorjem	3p25	razvoj maščobnega tkiva
<i>CEBPA</i>	<i>CCAAT<sup>a</sup>/enhancer binding protein alpha gene</i>	gen za beljakovino za vezavo ojačevalca CCAAT <sup>a</sup>	19q13.11	
<i>IL6</i>	<i>interleukin 6 gene</i>	gen za interleukin 6	7p21–p15	
<i>FABP4</i>	<i>fatty acid binding protein 4, adipocyte gene</i>	gen za vezavo maščobnih kislin	8q21.13	
<i>PNPLA3</i>	<i>patatin-like phospholipase domain containing gene</i>	gen za beljakovino z domeno patatinu podobne fosfolipaze 3	22q13.31	
<i>PLIN5</i>	<i>perilipin 5 gene</i>	gen za beljakovino, povezano z maščobnimi kapljicami 5	19p13.3	

<sup>a</sup> Zaporedje nukleotidov.

## Gensko zdravljenje

Vsaj pri monogenski obliki debelosti bi z vnosom normalnega gena v tkivo, ki gen izraža, vsaj teoretično lahko spremenili okvarjeni mehanizem, ki vodi v debelost. Uporabimo lahko več metod. Najpogostejše je uporabljena metoda vnosa gena z virusnim vektorjem. Ker je več genov, povezanih z debelostjo, izraženih v osrednjem živčnem sistemu, bi bil zaželen tarčni vnos v določen del možganov. Zato bi bila uporabna specifična vrsta virusnega vektorja – adeno-povezani virusni vektor. V laboratorijskih modelih so tako s povečanjem izražanja gena levkemije-zaviralnega dejavnika (angl. *leukemia-inhibitory factor*, LIF) z vnosom preko rekombinantnega adeno-povezanega virusnega vektorja zmanjšali telesno maso, vnos hrane in stopnjo maščobnega tkiva pri miših (18). Žal so ti še vseeno povezani z manjšo stopnjo imunскеga odziva. Pomanjkljivosti uporabe virusnih vektorjev so predvsem dolgotrajnost postopkov priprave, možnost vnosa le majhnih molekul DNA, pa tudi nevarnost neželenih sprememb genoma. V ta namen iščejo še druge, sprejemljivejše sisteme genskega zdravljenja (19). Primer je cepljenje s cepivom, ki bi vsebovalo zaporedno specifične nukleaze na regije genov, povezanih z debelostjo (npr. gen *FTO*) (20).

## Spreminjanje genskega zapisa z zaporedno specifičnimi nukleazami

V primerjavi s klasičnimi metodami genskega zdravljenja, ki temeljijo na uporabi adeno- ali retrovirusnih vektorjev, sodobna literatura pripisuje več možnosti za spremembe genoma za namene zdravljenja metodi zaporedno specifičnih nukleaz. Velika prednost metode je, da uporaba ni tako omejena na določene celične tipe. V primerjavi z RNAi (angl. *ribonucleic acid interference*), ki je potranskripcijski mehanizem razgradnje informacijskih ribonukleinskih kislin (angl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA)

ali zaviranja translacije, s čimer se prepreči oz. zavre izražanje specifičnega gena, je metoda fleksibilnejša, omogoča pa tudi stabilno in dolgotrajno spremembo gena brez potrebe po stalnih transfekcijah. Princip delovanja je podoben za vse metode, ki spadajo v to skupino. Sprva DNA razcepimo na specifičnem mestu z uporabo preoblikovane endonukleaze. Do sprememb v genski zasnovi (tukaj so vključene tako delecije kot insercije in zamenjave genov) pride zaradi prisotnosti popravljalnih mehanizmov preko nehomolognega združevanja koncev ali homologne rekombinacije (21).

Najstarejša metoda v omenjeni skupini vključuje uporabo nukleaz cinkovih prstov (angl. *zinc finger nucleases*, ZFN). Gaj in sodelavci že preizkušajo to metodo neposrednega utišanja genov, povezanih z debelostjo, ki bi omogočala tudi uporabo pri ljudeh (22). V primerjavi z novejšimi metodami je zahtevnejša tudi priprava, poleg tega pa ne obstajajo cinkovi prsti za vse možne triplete nukleotidov. Novejša, potencialno uporabnejša metoda na tem področju je poznana kot nukleaze za transkripcijskemu aktivatorju podobne efektorje (angl. *transcription activator-like effector nucleases*, TALEN) (21). To so umetno proizvedeni restrikcijski encimi, pridobljeni z združevanjem vezavnih mest transkripcijskemu aktivatorju podobnega efektorja (angl. *transcription activator-like effectors*, TALE) s cepitveno domeno. TALE so izolirani iz sevov bakterij *Xanthomonas*. Tem se biotehnološko odstrani aktivatorska domena na karboksilnem koncu, na njeno mesto pa se doda nukleaza FokI. Prednost te metode pred ZFN je, da prepozna po en nukleotid in tako omogoča prepoznavanje kateregakoli zaporedja DNA. Poleg tega je vezavna domena sestavljena iz tandemske ponovljenih motivov, dolgih med 11 in 24 baznih parov, zato omogoča večjo specifičnost. Še vedno pa si z metodo ZFN deli pomanjkljivost, da zahteva izdelavo specifičnih beljakovin za vsako ciljno zaporedje DNA. To težavo odpravimo

z uvedbo usmerjevalnih RNA pri metodi CRISPR/Cas9 (21).

Metoda CRISPR/Cas9 je med omenjenimi najnovejša, čeprav se za spreminjanje zaporedij v genomu ali izražanja genov v človeških celičnih kulturah, pa tudi *in vivo* pri različnih vrstah živali, uporablja že od leta 2012. Nakopičene redno razmaknjene kratke palindromne ponovitve (angl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR) so lokusi DNA, ki vsebujejo kratke ponovitve baznih zaporedij. Prisotne so predvsem v arhejah, in sicer pri 90 % vseh sekvenciranih genomov. Prvi del sestavlja RNA samostojnega nukleotida, ki se veže na komplementarno, ciljno zaporedje DNA. Drugi del sestavlja z nakopičenimi redno razmaknjenimi kratkimi palindromnimi ponovitvami povezana beljakovina (angl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein*, Cas) 9 nukleaza za razrez. Z vnosom plazmida z domeno Cas ter specifično ustvarjenimi CRISPR se lahko genom organizma preureja na želenem mestu. Nekateri poskusi genske terapije z metodo TALEN in CRISPR/Cas9 na človeških celicah so obetavni. Na spodbujenih matičnih celicah bolnika z dedno obliko mišične distrofije so Li in sodelavci leta 2015 uspeli popraviti mutacijo v genu za distrofin in pokazali funkcionalnost popravljenega gena. Pomanjkljivost metode je sicer nezanesljiva specifičnost, pa tudi potreba po prisotnosti zaporedja protospredkovnega sosednjega motiva (angl. *protospacer adjacent motif*, PAM). Prednost te najnovejše metode je, da omogoča razrez več ciljnih molekul hkrati. Obetaven nov možni način zdravljenja je tudi uporaba različice encima CRISPR povezane beljakovine 9, ki ima inaktivirano nukleazno aktivnost (angl. *CRISPR associated protein 9 endonuclease dead*, dCas9) in je lahko v povezavi z aktivatorjem ali represorjem. Taka beljakovina ohrani DNA-vezavno aktivnost in lahko povzroči večje ali manjše izražanje ciljnega gena brez povzročanja spre-

memb v sami DNA (21). Slednja lastnost je za gensko zdravljenje sprejemljivejša tudi z etičnega vidika, saj ne gre za spreminjanje dednega materiala.

Metode bi bile uporabne predvsem v primeru natančno identificiranih genov, npr. navedeni v tabeli 2, ki že sami znatno prispevajo k razvoju debelosti. Z uporabo primernih vektorjev za vnos to predstavlja zelo ugodno rešitev za težavo ciljanja specifičnih zaporedij v celicah osrednjega živčevja in periferije. Potrebna je izdelava ustreznih knjižnic ciljnih zaporedij. Uporaba metode CRISPR/Cas9 bi bila še posebej koristna za zdravljenje poligenske oblike debelosti, predvsem zaradi možnosti spreminjanja patogenih mutacij ali nepravilnega profila izražanja več genov hkrati. Preden lahko metoda pride v uporabo v medicinske namene, bi bilo potrebno zagotoviti njeno popolno varnost in zanesljivost. Predvsem bi morali poskrbeti, da so metode res specifične glede na ciljno zaporedje in da ne povzročajo imunogenosti ali rakotvornosti. Poleg tega se iščejo tudi alternativni vektorji za prenos v bolnika, ki bi nadomestili viruse.

### **Posredne metode spreminjanja izražanja genov z interferenčnimi ribonukleinskimi kislinami**

V zadnjem desetletju je bilo veliko raziskav usmerjenih v razvoj tehnologij z uporabo interferenčnih molekul RNA. Male interferenčne ribonukleinske kisline (angl. *small interfering ribonucleic acid*, siRNA) se namreč lahko vežejo na mRNA in vplivajo na izražanje genov. Utišanje genov lahko deluje preko dveh mehanizmov: utišanje genov po prepisu (angl. *post-transcriptional gene silencing*, PTGS) ali utišanje genov med prepisom. PTGS lahko nadalje delimo še na neposredno zaporedno specifično razcepljanje in zaviranje prevajanja zaporedja ter razkroj RNA. Gene lahko ciljamo z eksogenim vnosom siRNA, ki pa nato izkoristi endogeni mehanizem PTGS. Zaradi velikosti in negativne nabitosti pa s težavo prehajajo skozi

celične membrane (19). Kljub temu so s to metodo izvedli že veliko uspešnih raziskav zdravljenja debelosti pri laboratorijskih živalih. Z uporabo interferenčnih RNA so pri kuncih uspeli utišati gen *Apobec1*, povezan z absorpcijo maščobe v črevesju, in tako zmanjšali vnos energije ter možnost razvoja debelosti (22). Metode RNAi trenutno še niso povsem varne za klinično uporabo. Težave so se pojavile pri kopičenju prenašalnih dejavnikov in delovanju na neciljne gene ter nezaželenem aktiviranju celičnega imunskega sistema (19).

## **UPORABA BIOTEHNOLOŠKIH METOD ZA OPREDELITEV TARČNIH GENOV IN MEHANIZMOV PRI ZDRAVLJENJU DEBELOSTI**

### **Asociacijske raziskave na celotnem genomu**

Raziskave GWAS omogočajo hkratno analizo več 1.000 polimorfizmov, ki se nato uporabijo za proučevanje interakcij med genetskimi in okoljskimi dejavniki. Njihova največja uporabnost je v tem, da lahko identificirajo gene z relativno majhnim vplivom, kar je s klasično genetiko kartiranja v družinah praktično nemogoče. Pri debelosti so pomembni predvsem geni, povezani s presnovnim sindromom, maščobnim tkivom in obsegom pasu. Z upoštevanjem okoljskih vplivov in variabilnosti genov skozi generacije so posameznikom omogočene vedno natančnejše ocene tveganja. Z GWAS so leta 2007 identificirali tudi gen *FTO*, prvi polimorfizem posameznega nukleotida z robustno povezavo z debelostjo (23).

### **Uporaba različic v številu kopij pri iskanju ciljnih genov**

Kot pri nekaterih drugih tipih kompleksnih bolezni (zlasti psihiatričnih, avtoimunskih in nevrodegenerativnih), imajo tudi pri etiologiji debelosti pomembno vlogo različice v številu kopij genov (RŠK). Gre za obliko genomske variabilnosti, vezane na do

nekaj megabaz dolga zaporedja DNA, ki so v genomu prisotna v raznovrstnem številu kopij. Frekvenca mutacij je mnogo večja kot pri polimorfizmu posameznih nukleotidov. S kartiranjem visoke ločljivosti prekinitvenih točk je možno oceniti velikost, vpliv na gene in regulatorne elemente ter možne posledice RŠK (24). S pregledom podatkovnih baz je bilo opredeljenih več RŠK, ki vplivajo na debelost. Med novejša odkritja sodi zmanjšana prisotnost RŠK v genu *AMY1*, ki kodira amilazo v slini, katere pomanjkanje posredno prispeva k razvoju debelosti (25). Z uporabo RŠK je možno proučevati natančnejše vzroke ne le monogenih, temveč tudi sindromskih in poligenjskih oblik debelosti. To bo v prihodnosti omogočilo iskanje načinov poseganja v gene oz. presnovne poti, ki do te bolezni privedejo. Patološke spremembe bi bilo mogoče odpraviti z uvedbo genskega zdravljenja (26).

### **Uporaba aptamerov pri iskanju biooznačevalcev ter razvoju zdravljenja**

Aptameri RNA so majhne molekule oligo-RNA, ki se lahko vežejo na specifično ciljno molekulo. Pridobiti jih je mogoče z izborom iz večjih naborov naključnih zaporedij preko *in vitro* selekcijskega postopka, imenovanega sistematska evolucija ligandov skozi poskusno obogatitev (angl. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, SELEX). Aptameri, pridobljeni z metodo SELEX, omogočajo alternativni način odkrivanja biooznačevalcev za specifično prepoznavo celične površine. Zaradi boljše specifičnosti od protiteles bi bili primerni za uporabo v obstoječih metodah diagnostike, kot so encimska imunoabsorpcijska preiskava (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) ali prenos *western* (26). Na ta način je bilo odkritih že več aptamerov, ki specifično prepoznajo odrasle maščobne celice, in med katere spadajo MA-33 in 91 (specifična za odrasle bele maščobne celice) ter adipo-1 in adipo-8 (27, 28).

## **Sistemska medicina: razvoj presnovnih modelov**

Pri novejših pristopih k odkrivanju novih načinov zdravljenja debelosti je lahko učinkovita tudi uporaba presnovnih modelov na ravni genoma (angl. *genome-scale metabolic models*, GEM) posameznikov in posledična prilagoditev zdravljenja. GEM vsebujejo podatke o encimskih reakcijah, specifičnih za posamezno vrsto celic, tkivo ali organizem, in omogočajo analizo specifičnih reakcij in presnovnih poti ter njihovo vlogo v celični fiziologiji. Z GEM je mogoče pridobiti informacije, povezane (29):

- s presnovo,
- z obdelavo podatkov o genih in okolju,
- s celičnimi postopki,
- s človeškimi boleznimi in
- z razvojem učinkovin.

Za boljše razumevanje debelosti in njene povezave s presnovnim sindromom ter povezanimi boleznimi so se raziskovalci osredotočili na glukozno-inzulinski sistem nadzora ter vzpostavili maksimalne in minimalne modele presnove. Maksimalni modeli presnove uporabljajo velike količine parametrov za vzpostavljanje znanja o presnovnem uravnavanju, minimalni pa opisujejo glavne komponente sistemskega

delovanja (29). Tovrstna uspešna povezava bioinformatike, biotehnologije in medicine bi znatno prispevala k iskanju novih biooznačevalcev ter k razvoju na področju farmakogenomike in novih tarč zdravil.

## **ZAKLJUČEK**

Čezmeren vnos in nezadostna poraba energije sta osnovna mehanizma, ki vodita v povečanje telesne mase oz. debelost. Učinkovitost in varnost zdravljenja debelosti (predvsem izrazite) trenutno še nista na zaželeni ravni. S tega vidika predstavlja zapleteno genetsko ozadje debelosti in zapletene interakcije med genetsko zasnovo ter okoljem veliko oviro. Biotehnoške metode že uporabljamo za opredelitev vzrokov debelosti in pri izdelavi zdravilnih učinkovin ter strategij zdravljenja. Z razvojem teh metod bomo v prihodnosti lahko razvili še boljše orodja tako za opredelitev vzrokov, ki vodijo v debelost, kot za načrtovanje učinkovitega in varnega zdravljenja. V članku smo opredelili več biotehnoških rešitev, ki pa žal v kratkem še ne bodo na voljo. Preden bodo ti načini zdravljenja uspešno vključeni v zdravljenje debelosti, jih je potrebno še optimizirati in obsežno preizkusiti v vseh fazah kliničnih raziskav.



## LITERATURA

1. Misra M. Obesity pharmacotherapy: current perspectives and future directions. *Curr Cardiol Rev.* 2013; 9 (1): 33–54.
2. Yanovski SZ, Yanovski JA. Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review. *JAMA.* 2014; 311 (1): 74–86.
3. Cooper GM. *The cell: a molecular approach.* 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc; 2000.
4. Farooqi SI. Genetic, molecular and physiological mechanisms involved in human obesity: Society for Endocrinology Medal Lecture 2012. *Clinical Endocrinol (Oxf).* 2015; 82 (1): 23–8.
5. Fogtelloo AJ, Pijl H, Frölich M, et al. Effects of recombinant human leptin treatment as an adjunct of moderate energy restriction on body weight, resting energy expenditure and energy intake in obese humans. *Diabetes Nutr Metab.* 2003; 16 (2): 109–14.
6. Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, et al. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98 (8): 4652–7.
7. Marshall S, Barbosa M; Xencor Inc. Ciliary neurotrophic factor variants. United States Patent US 2005064555. 2005 Mar 24.
8. Pipeline [internet]. Xencor; c2014 [citirano 2014 Apr 13]. Dosegljivo na: <http://www.xencor.com/pipeline/>
9. Russell M, Bredella M, Tsai P, et al. Relative growth hormone deficiency and cortisol excess are associated with increased cardiovascular risk markers in obese adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94 (8): 2864–71.
10. Misra M, Bredella MA, Tsai P, et al. Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295 (2): E385–E92.
11. Mekala KC, Tritos NA. Effects of recombinant human growth hormone therapy in obesity in adults: a meta analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94 (1): 130–7.
12. Deal CL, Tony M, Höybye C, et al. Growth hormone research society workshop summary: consensus guidelines for recombinant human growth hormone therapy in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98 (6): E1072–E87.
13. Child CJ, Zimmermann AG, Scott RS, et al. Prevalence and incidence of diabetes mellitus in GH-treated children and adolescents: analysis from the GeNeSIS observational research program. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96 (6): E1025–E34.
14. Poidvin A, Touzé E, Ecosse E, et al. Growth hormone treatment for childhood short stature and risk of stroke in early adulthood. *Neurology.* 2014; 83 (9): 780–6.
15. Myalept [internet]. RxList; c2014 [citirano 2014 Apr 5]. Dosegljivo na: <http://www.rxlist.com/myalept-drug.htm>
16. Moon HS, Matarese G, Brennan AM, et al. Efficacy of metreleptin in obese patients with type 2 diabetes: cellular and molecular pathways underlying leptin tolerance. *Diabetes.* 2011; 60 (6): 1647–56.
17. Molerés A, Martínez JA, Martí A. Genetics of obesity. *Curr Obes Rep.* 2013; (2): 23–31.
18. Huvenne H, Dubern B, Clément K, et al. Rare genetic forms of obesity: clinical approach and current treatments in 2016. *Obes Facts.* 2016; 9 (3): 158–73.
19. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature.* 2009; 457 (7228): 426–33.
20. Laber S, Cox RD. Commentary: FTO obesity variant circuitry and adipocyte browning in humans. *Front Genet.* 2015; 6: 318.
21. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31 (7): 397–405.
22. Jolivet G, Braud S, DaSilva B, et al. Induction of body weight loss through RNAi-knockdown of *APOBEC1* gene expression in transgenic rabbits. *PLoS One.* 2014; 9 (9): e106655.
23. Fall T, Ingelsson E. Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 382 (1): 740–57.
24. Cooper DN, Chen JM, Ball EV, et al. Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Hum Mutat.* 2010; 31 (6): 631–55.
25. Greenhill C. Obesity. Copy number variants in *AMY1* connected with obesity via carbohydrate metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10 (6): 312.

26. Kang KN, Lee YS. RNA aptamers: a review of recent trends and applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013; 131: 153–69.
27. Kim EY, Kim JW, Kim WK, et al. Selection of aptamers for mature white adipocytes by cell SELEX using flow cytometry. *PLoS One.* 2014; 9 (5): e97747.
28. Liu J, Liu H, Sefah K, et al. Selection of aptamers specific for adipose tissue. *PLoS One.* 2012; 7 (5): e37789.
29. Mardinoglu A, Nielsen J. Systems medicine and metabolic modeling. *J Int Med.* 2012; 271 (2): 142–54.

Prispelo 14. 10. 2016